

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 12 SEP 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
 einer Patentanmeldung**

BEST AVAILABLE COPY

Aktenzeichen: 102 34 192.3

Anmeldetag: 26. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Dr. med. Ferdinand Hermann B a h l m a n n ,
 Hannover/DE

Bezeichnung: Verwendung von Erythropoetin

IPC: A 61 K 38/18

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
 Der Präsident
 Im Auftrag

Klostermeyer

Gleiss & Große

Patentanwälte · Rechtsanwälte
European Patent Attorneys
European Trademark Attorneys

Intellectual Property Law
Technology Law

D-70469 Stuttgart
Heilbronner Straße 293
Telefon: +49 (0)711 99 3 11-0
Telefax: +49 (0)711 99 3 11-200
E-Mail: office@gleiss-grosse.com
Homepage: www.gleiss-grosse.com

Dr. jur. Alf-Olav Gleiss · Dipl.-Ing. · PA
Rainer Große · Dipl.-Ing. · PA
Dr. Andreas Schrell · Dipl.-Biol. · PA
Torsten Armin Krüger · RA
Nils Helde · RA
Armin Eugen Stockinger · RA
Georg Brisch · Dipl.-Ing. · PA
Erik Graf v. Baudissin · RA

PA: Patentanwalt · European Patent Attorney
European Trademark Attorney
RA: Rechtsanwalt · Attorney-at-law

In cooperation with
Shanghai Zhi Xin Patent Agency Ltd.
Shanghai · China

Patentanmeldung

Verwendung von Erythropoetin

Dr. med. Ferdinand Hermann Bahlmann
Tieckstraße 24

30625 HANNOVER

5 **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Erythropoietin zur Stimulierung der physiologischen Mobilisierung, Proliferation und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen, zur Stimulierung der Vaskulogenese, zur Therapie von Krankheiten, die mit einer Dysfunktion endothelialer Vorläuferzellen im Zusammenhang stehen, und zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen zur Behandlung solcher Krankheiten sowie pharmazeutische Zusammensetzungen, die Erythropoietin und andere geeignete Wirkstoffe zur Stimulation endothelialer Vorläuferzellen umfassen.

Das Gefäßendothel ist eine Schicht von Zellen, die die Blutgefäße auskleidet. Das Endothel trennt das Blut von anderen Gefäßschichten, wobei das Endothel nicht allein eine passive Barriere darstellt, sondern aktiv in die Regulation des Gefäßtonus eingreift. Dementsprechend wird auch von einer Endothel-abhängigen Vasodilatation gesprochen. Auf Grund seiner Lage ist das Endothel permanent dem hämodynamischen Stress und dem metabolischen Stress ausgesetzt. Bei pathogenen Zuständen, beispielsweise erhöhtem Blutdruck, erhöhten LDL-Werten oder erhöhtem Blutzucker, kommt es daher häufig zu funktionellen Defekten des Endothels, denen dann morphologisch fassbare Schäden, wie die Bildung atherosklerotischer Plaques folgen können. Ein sehr

frühes Zeichen einer geänderten beziehungsweise reduzierten endothelialen Funktion beziehungsweise endothelialen Dysfunktion ist eine Verminderung der Endothel-abhängigen Vasodilatation.

- 5 Bei koronarer Herzkrankheit (KHK), aber auch bei vorhandenen Risikofaktoren ohne KHK, beispielsweise Hypertonie, Hyperlipoproteinämie oder Diabetes, äußern sich Endothel-Funktionsdefekte in einer verminderten Produktion von NO (=EDRF) und erhöhter
- 10 Endothelin-Produktion. Hohe Plasmaspiegel von Endothelin führen zu abnormalem Zusammenwachsen von Zellen, Entzündungen, Gefäßwucherungen und starken Gefäßverengungen. Endothel-Funktionsstörungen sind zudem durch eine verstärkte Produktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 gekennzeichnet,
- 15 wodurch Thromozyten und Monozyten in erhöhtem Maße am Endothel haften. Dadurch bedingt kommt es zu einer Erhöhung des Gefäßtonus. Somit bildet sich bei verschiedensten Systemen ein Ungleichgewicht heraus, wobei Vasokonstriktion, Adhäsion, Aggregation, Koagulation, Atherosklerose und Atherothrombose begünstigt werden. Selbst mentaler Stress führt zu einer messbaren Endothel-Dysfunktion, die bis zu 4
- 20 Stunden anhalten kann.
- 25 Endothelzellen sind auch an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt. Die Bildung von Blutgefäßen ist bei einer Vielzahl von Vorgängen, wie zum Beispiel der Embryogenese, dem weiblichen Reproduktionszyklus, der Wundheilung, dem Tumorwachstum und der Neovaskularisierung ischämischer Bereiche, von Bedeutung. Ursprünglich wurde die postnatale Blutgefäßbildung, also die Blutgefäßbildung nach der Geburt,
- 30

hauptsächlich auf angiogenetische Prozesse zurückgeführt. Unter Angiogenese wird die Ausbildung neuer Blutgefäße durch das Aussprossen von Kapillaren aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem verstanden. Bei der Angiogenese wird zunächst die die
5 Blutgefäße umgebende Basalmembran mittels proteolytischer Enzyme abgebaut und die extrazelluläre Matrix im perivaskulären Raum fragmentiert. Die dabei freigesetzten angiogenen Stimuli bewirken, dass be-
10 reits vorhandene ausdifferenzierte Endothelzellen in Richtung des chemotaktischen Reizes migrieren, wobei sie gleichzeitig proliferieren und umgebaut werden. Durch die Aneinanderlagerung von Endothelzellen werden dann neue Gefäßschleifen mit einem
15 kapillarförmigen Lumen ausgebildet. Danach setzt die Synthese einer neuen Basalmembran ein.

Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Bildung neuer Blutgefäße im adulten Organismus nicht nur auf Angiogenese beruht, sondern auch auf vasku-
20 logenetischen Mechanismen. Unter Vaskulogenese wird die Gefäßneubildung aus sich in situ differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen verstanden. Das Dogma, dass die Vaskulogenese auf die Embryogenese beschränkt ist, wurde durch den Nachweis endo-
25 thelialer Vorläuferzellen (EPC) im peripheren Blut von gesunden Menschen und Tieren widerlegt. Unter Verwendung von Tiermodellen konnte belegt werden, dass die aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen aktiv an der Neovaskularisation
30 beteiligt sind. Auch wurde gezeigt, dass sich an ischämischen Stellen eine spezifische CD34-positive Untergruppe von Leukozyten festsetzt, die Endothelspezifische Antigene exprimiert. Darüber hinaus

lassen sich aus CD133⁺- und CD34⁺-Zellen in vitro endotheliale Vorläuferzellen (EPC) gewinnen, die einen signifikanten Beitrag zur Blutgefäßbildung im adulten Organismus leisten (Asahara et al., Science, 275 (1997), 964-967; Crosby et al., Circ. Res., 87 (2000), 728-730; Gehling et al., Blood, 95 (2000), 3106-3112). Ferner wurde gezeigt, dass die Injektion von isolierten CD34⁺-Zellen oder kultivierten endothelialen Vorläuferzellen die Wiederherstellung des Blutflusses bei diabetischen Mäusen beschleunigt (Schatteman et al., J. Clin. Invest., 106 (2000), 571-578) und die Neovaskularisierung in vivo verbessert (Asahara et al., Circ. Res., 85 (1999), 221-228; Crosby et al., Circ. Res., 87 (2000), 728-730; Murohara et al., J. Clin. Invest., 105 (2000), 1527-1536). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine durch CD34⁺-Zellen induzierte Neovaskularisierung die Herzfunktion verbessert (Kocher et al., Nat. Med., 7 (2001), 430-436).

Die der Mobilisierung und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Molekular- und zellbiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass verschiedene Cytokine und angiogene Wachstumsfaktoren stimulierend auf die Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen im Knochenmark wirken. So ist bekannt, dass proangiogene Faktoren wie VEGF und GM-CSF die Anzahl endothelialer Vorläuferzellen erhöhen können (Asahara et al., EMBO J., 18 (1999), 3964-3972; Takahashi et al., Nat. Med., 5 (1999), 434-438). Bei VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) handelt es sich um ein in verschiedenen Isoformen vorkommendes Protein,

das an die beiden Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGF-R1 (flt-1) und VEGF-R2 (flk-1) bindet, die beispielsweise auf der Oberfläche wachsender Endothelzellen vorkommen (Wernert et al., Angew. Chemie, 21
5 (1999), 3432-3435). Die Aktivierung der VEGF-Rezeptoren führt über den Ras-Raf-MAP-Kinase-Weg zur Expression von Proteinasen und spezifischen Integrinen auf der Oberfläche von Endothelzellen beziehungsweise endothelialen Vorläuferzellen und
10 schließlich zur Initiierung der Proliferation und Migration dieser Zellen in Richtung des angiogenen Stimulus. Bei GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) handelt es sich um ein Cytokin, das bislang vor allem für die Stimula-
15 tion weißer Blutkörperchen einschließlich Neutrophiler, Makrophagen und Eosinophiler bekannt war. Von PIGF (Plazenta-Wachstumsfaktor) ist bekannt, dass er die Mobilisierung von Endothel-Vorläuferzellen stimuliert, nicht jedoch deren Pro-
20 liferation. Aus Untersuchungen von Llevadot et al. (J. Clin. Invest., 108 (2001), 399-405) geht hervor, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, insbesondere Statine, die als Lipid-senkende Medikamente eingesetzt werden und Morbidität und Mortalität von
25 Koronarkrankheit reduzieren, endotheliale Vorläuferzellen mobilisieren können. Dimmeler et al. (J. Clin. Invest., 108 (2001), 391-397) konnten ferner zeigen, dass Statine wie Atorvastatin und Simvastatin die Differenzierung endothelialer Vorläuferzel-
30 len in mononucleären Zellen und CD34⁺-Stammzellen, die aus peripherem Blut isoliert wurden, in vitro und in vivo signifikant verbessern. So führte die Behandlung von Mäusen mit Statinen zu einer erhöhten Anzahl differenzierter endothelialer Vorläufer-

zellen, wobei Statine eine gleich starke Wirkung wie VEGF zeigten.

Die Stimulierung der Mobilisierung und/oder Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen stellt eine wichtige neue therapeutische Strategie zur Erhöhung der postnatalen Neovaskularisation, insbesondere der Vaskulogenese, und zur Behandlung von Krankheiten, die im Zusammenhang mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen stehen, dar.

Der vorliegenden Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, Mittel und Verfahren zur verbesserten Stimulation endothelialer Vorläuferzellen und zur Therapie von Erkrankungen bereitzustellen, die im Zusammenhang mit einer Dysfunktion endothelialer Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen stehen.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch die Lehre, Erythropoietin und/oder dessen Derivate zur Stimulation der physiologischen Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen, der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen, der Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen zu Endothelzellen und/oder der Migration endothelialer Vorläuferzellen in Richtung eines angiogenen oder vaskulogenen Stimulus in einem menschlichen oder tierischen Körper zu verwenden. Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem auch durch die Lehre, Erythropoietin und/oder dessen Derivate zur Therapie von Krankheiten oder krankhafte Zuständen, die mit einer Dysfunktion von endothelia-

len Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen, zu verwenden.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass eine Behandlung mit Erythropoietin zur
5 physiologischen Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen führt, wobei die Anzahl zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen erhöht und deren Differenzierung induziert wird. Darüber hinaus werden
10 unter bestimmten pathologischen Zuständen auftretende funktionelle Defizite der endothelialen Vorläuferzellen ausgeglichen. Erfindungsgemäß konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung im Endstadium die Anzahl zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen genauso hoch
15 ist wie bei gesunden Probanden, wobei die endothelialen Vorläuferzellen bei diesen Patienten jedoch die Fähigkeit zur Differenzierung zu Endothelzellen verloren haben. So ist bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung die Anzahl von Zellen, die
20 adhäsionsfähig sind und einen endothelialen Zell-Phänotyp zeigen, gegenüber gesunden Probanden deutlich vermindert. Erfindungsgemäß wurde nun festgestellt, dass nach Behandlung dieser Patienten mit Erythropoietin die Anzahl zirkulierender Stammzellen
25 signifikant um mehr als 50% ansteigt. Dabei erhöht sich insbesondere die Anzahl von Zellen, die einen endothelialen Phänotyp entwickeln, dramatisch. Wie mittels eines funktionellen Zellkulturtestes nachgewiesen, erhöht sich durch die Erythropoietin-Behandlung die bei den Patienten mit
30 chronischer Nierenerkrankung beeinträchtigte Fähigkeit der endothelialen Vorläuferzellen zur Adhäsion um das Dreifache. Die Fähigkeit von sich diffe-

renzierenden endothelialen Vorläuferzellen beziehungsweise von Endothelzellen zur Adhäsion ist eine der Grundvoraussetzungen zur Ausbildung neuer Gewebe und/oder Gefäße. Erythropoietin kann auf diese

5 Weise die Neovaskularisierung, insbesondere die Vaskulogenese, in Geweben oder Organen, in denen entsprechende vaskulogene oder angiogene Stimuli freigesetzt werden, induzieren.

Erfindungsgemäß kann Erythropoietin (im Folgenden EPO genannt) zur Stimulierung der physiologischen Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen, der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen, der Differenzierung der endothelialen Vorläuferzellen zu Endothelzellen und/oder zur Migration endothelialer Vorläuferzellen in Richtung eines vaskulogenen oder angiogenen Stimulus in einem menschlichen oder tierischen Körper, insbesondere einem adulten Organismus, verwendet werden. Erfindungsgemäß kann Erythropoietin daher in vorteilhafter Weise zur Stimulation der Gefäßneubildung durch Vaskulogenese in Geweben oder Organen eingesetzt werden, in denen pathologische Gefäßveränderungen vorliegen. Durch die Stimulation endothelialer Vorläuferzellen durch Erythropoietin kann darüber hinaus auch die Bildung

10 von Endothelgewebe induziert werden. Erfindungsgemäß kann Erythropoietin daher auch zur Behandlung von Krankheiten des menschlichen oder tierischen Körpers eingesetzt werden, die im Zusammenhang mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen.

15
20
25
30

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Erythropoietin“ beziehungsweise „EPO“ ein

Stoff verstanden, der das Wachstum, die Differenzierung und die Reifung von Stammzellen über Erythroblasten zu Erythrocyten steuert. Erythropoietin ist ein Glycoprotein, welches 166 Aminosäuren, drei Glycosylierungsstellen und ein Molekulargewicht von etwa 34.000 Da aufweist. Im Rahmen einer EPO-induzierten Differenzierung von Erythrocyten-Vorläuferzellen wird die Globinsynthese induziert und die Synthese des Häm-Komplexes sowie die Anzahl der Ferritin-Rezeptoren gesteigert. Dadurch kann die Zelle mehr Eisen aufnehmen und funktionelles Hämoglobin synthetisieren. In den reifen Erythrocyten bindet Hämoglobin den Sauerstoff. Somit nehmen die Erythrocyten beziehungsweise das in ihnen enthaltene Hämoglobin eine Schlüsselrolle für die Sauerstoffversorgung des Organismus ein. Ausgelöst werden diese Vorgänge durch die Wechselwirkung von EPO mit einem entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche der Erythrocyten-Vorläuferzellen (Graber und Krantz, Ann. Rev. Med. 29 (1978), 51-56).

Erythropoietin wird hauptsächlich in der Niere gebildet, findet sich aber auch in geringen Mengen im Serum und wird unter physiologischen Bedingungen zumindest teilweise im Urin ausgeschieden. Patienten mit Niereninsuffizienz können nur unzureichend Erythropoietin (im Folgenden EPO genannt) bilden und leiden demzufolge an einer Anämie. Bekannt ist es, die Erythropoietin-Unterversorgung durch Verabreichung von Erythropoietin zu kompensieren. Weitere klinische Anwendungen von Erythropoietin liegen in der Applikation von Erythropoietin bei iatrogenen Anämie nach Chemotherapie oder Strahlentherapie malignen Erkrankungen oder Virusinfektionen (0 456

153 B1). Aus der US 4,732,889 ist es bekannt, Erythropoietin enthaltende Zusammensetzungen zur Behandlung von mit rheumatoider Arthritis assoziierter Anämie einzusetzen. Aus der WO 88/03808 ist die
5 Behandlung von Hämochromatosis mittels EPO-haltiger Zusammensetzungen bekannt.

Der hier verwendete Begriff „Erythropoietin“ umfasst EPO jeglicher Herkunft, insbesondere menschliches oder tierisches EPO. Der hier verwendete
10 Begriff erfasst nicht nur die natürlich vorkommenden, das heißt Wildtypformen von EPO, sondern auch seine Derivate, Analoga, Modifikationen, Muteine, Mutanten oder Sonstiges, solange sie die biologischen Wirkungen von Wildtyp-Erythropoietin zeigen.

15 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter "Derivaten" funktionelle Äquivalente oder Abkömmlinge von Erythropoietin verstanden, die unter Beibehaltung der Erythropoietin-Grundstruktur durch Substitution von Atomen oder Molekülgruppen
20 beziehungsweise -resten erhalten werden und/oder deren Aminosäuresequenzen sich von der des natürlicherweise vorkommenden menschlichen oder tierischen Erythropoietin-Proteins an mindestens einer Position unterscheiden, die aber im wesentlichen einen
25 hohen Grad an Homologie auf der Aminosäureebene und vergleichbare biologische Aktivität aufweisen. Derivate des Erythropoietins, wie sie beispielsweise in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, sind beispielsweise bekannt aus der WO
30 94/25055, der EP 0 148 605 B1 oder der WO 95/05465.

"Homologie" bedeutet insbesondere eine Sequenzidentität von mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 85 % und besonders bevorzugt mindestens mehr als 90 %, 95 %, 97 % und 99 %. Der dem Fachmann bekannte Ausdruck der "Homologie" bezeichnet somit den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehreren Polypeptid-Molekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird. Dabei kann eine Übereinstimmung sowohl eine identische Übereinstimmung als auch ein konservativer Aminosäureaustausch bedeuten.

Erfindungsgemäß umfasst der Begriff "Derivat" auch Fusionsproteine, bei denen am N-terminalen Teil beziehungsweise am C-terminalen Teil funktionelle Domänen eines anderen Proteins vorhanden sind. In einer Ausführungsform der Erfindung kann es sich bei diesem anderen Protein beispielsweise um GM-CSF, VEGF, PIGF, ein Statin oder einen anderen Faktor handeln, der eine stimulierende Wirkung auf endotheliale Vorläuferzellen aufweist. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann es sich bei dem anderen Protein auch um einen Faktor handeln, der stimulierende Wirkung auf ausdifferenzierte Endothelzellen hat, beispielsweise um Angiogenin oder bFGF (basic fibroblast growth factor). Von bFGF ist bekannt, dass dieser Wachstumsfaktor eine starke mitogene und chemotaktische Aktivität auf Endothelzellen ausübt.

Die Unterschiede zwischen einem Erythropoietin-Derivat und nativem Erythropoietin können beispielsweise durch Mutationen, wie zum Beispiel Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Anlagerun-

gen, Basenaustausche und/oder Rekombinationen der die Erythropoietin-Aminosäuresequenzen codierenden Nucleotidsequenzen entstanden sein. Selbstverständlich kann es sich dabei auch um natürlicherweise auftretende Sequenzvariationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus einem anderen Organismus oder um Sequenzen, die auf natürliche Weise mutiert wurden, oder Mutationen, die mit Hilfe üblicher, auf dem Fachgebiet bekannter Mittel, beispielsweise chemische Agenzien und/oder physikalische Agenzien, gezielt in die Erythropoietin codierenden Nucleinsäuresequenzen eingeführt wurden. Im Zusammenhang mit der Erfindung umfasst der Begriff „Derivat“ daher auch mutierte Erythropoietin-Moleküle, also Erythropoietin-Muteine.

Erfindungsgemäß können auch Peptid- oder Protein-Analoga von Erythropoietin eingesetzt werden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung umfasst der Begriff „Analoga“ Verbindungen, die keine mit der Erythropoietin-Aminosäuresequenz identische Aminosäuresequenz aufweisen, deren dreidimensionale Struktur jedoch der von Erythropoietin stark ähnelt und die daher eine vergleichbare biologische Aktivität aufweisen. Bei Erythropoietin-Analoga kann es sich beispielsweise um Verbindungen handeln, die die für die Bindung von Erythropoietin an dessen Rezeptoren verantwortlichen Aminosäurereste in geeigneter Konformation enthalten und die daher die essentiellen Oberflächeneigenschaften des Erythropoietin-Bindungsbereiches nachahmen können. Derartige Verbindungen sind beispielsweise in Wrighton et al., Science, 273 (1996), 458, beschrieben.

Das erfindungsgemäß eingesetzte EPO kann auf verschiedene Weise hergestellt werden, beispielsweise durch Isolierung aus menschlichem Urin oder aus dem Urin oder Plasma (einschließlich Serum) von an aplastischer Anämie leidenden Patienten (Miyake et al., J.B.C. 252 (1977), 5558). Menschliches EPO kann beispielsweise auch aus Gewebekulturen von menschlichen Nierenkrebszellen (JA-OS 55790/1979), aus menschlichen Lymphoblastenzellen, die die Fähigkeit zur Bildung von menschlichem EPO aufweisen (JA-OS 40411/1982) und aus einer durch Zellfusion einer menschlichen Zelllinie erhaltenen Hybridomakultur gewonnen werden. EPO kann auch durch gentechnologische Verfahren hergestellt werden, indem man mittels geeigneter DNA oder RNA, die für die entsprechende Aminosäuresequenz des EPO codiert, gentechnisch das erwünschte Protein herstellt, zum Beispiel in einem Bakterium, einer Hefe, einer Pflanzen- oder Tierzelllinie. Derartige Verfahren sind beispielsweise in der EP 0 148 605 B2 oder der EP 0 205 564 B2 sowie der EP 0 411 678 B1 beschrieben.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung von Erythropoietin (im Folgenden EPO genannt) und/oder dessen Derivaten zur Stimulierung der physiologischen Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen, der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen, der Differenzierung der endothelialen Vorläuferzellen zu Endothelzellen und/oder zur Migration endothelialer Vorläuferzellen in Richtung eines vaskulogenen oder angiogenen Stimulus in einem menschlichen oder tierischen Körper, insbesondere einem adulten Organismus.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „endothelialen Vorläuferzellen“ im Blutkreislauf zirkulierende Zellen verstanden, die die Fähigkeit zur Differenzierung zu Endothelzellen besitzen. Bei den während der Embryonalentwicklung vorkommenden endothelialen Vorläuferzellen handelt es sich um Angioblasten. Bei den im adulten Organismus vorkommenden endothelialen Vorläuferzellen handelt es sich um Angioblasten-ähnliche Zellen, die aus mononucleären Zellen und/oder CD34⁺-Stammzellen, die aus peripherem Blut isoliert wurden, gewonnen werden können.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Mobilisierung“ oder „physiologischer Mobilisierung“ der Prozess des Aktivierens von Stammzellen aus dem Knochenmark durch Wachstumsfaktoren verstanden, wobei die Stammzellen in den Blutkreislauf, insbesondere ins periphere Blut, gelangen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Proliferation“ die Fähigkeit von Zellen zur Vergrößerung und zur anschließenden Teilung in zwei oder mehr Tochterzellen verstanden. Die EPO-vermittelte Stimulierung endothelialer Vorläuferzellen betrifft somit insbesondere die Anzahl und damit das Teilungsverhalten endothelialer Vorläuferzellen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Differenzierung“ endothelialer Vorläuferzellen die Entwicklung endothelialer Vorläuferzellen zu Endothelzellen verstanden. Unter „Endothelzellen“ werden die Zellen verstanden, die das Endo-

thel, das heißt die einschichtige zellige Ausklei-
dung von Gefäßen und serösen Höhlen, bilden. Endo-
thelzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie
gefäßaktive Substanzen, beispielsweise gefäßerwei-
5 ternde Substanzen wie EDRF (endothelial derived re-
laxing factor) oder konstringierenden Substanzen
wie Endothelin, Faktoren zur Hemmung oder Aktivie-
rung der Blutgerinnung und Faktoren zur Regulation
der Gefäßpermeabilität freisetzen. Endothelzellen
10 synthetisieren auch Komponenten des subendothelia-
len Bindegewebes, insbesondere Collagene vom Typ IV
und V, Zellhaftproteine wie Laminin, Fibronectin
und Thrombospondin, Wachstumsfaktoren, beispiels-
weise für glatte Muskelzellen, und Faktoren zur Ge-
15 fäßneubildung.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird
unter „Migration“ der endothelialen Vorläuferzellen
verstanden, dass die im Blutkreislauf befindlichen
endothelialen Vorläuferzellen in Richtung eines
20 vaskulogenen oder angiogenen Stimulus wandern und
sich im Bereich des vaskulogenen oder angiogenen
Stimulus konzentrieren. Unter einem „vaskulogenen
Stimulus“ wird ein chemischer Reiz in einem Gewebe
oder Blutgefäß eines menschlichen oder tierischen
25 Körpers verstanden, der spezifisch auf endotheliale
Vorläuferzellen wirkt und deren Wanderung zu der
Stelle des Körpers bewirkt, von der der chemische
Reiz ausgeht. Durch den vaskulogenen Stimulus wird
auf diese Weise der Prozess der Vaskulogenese indu-
30 ziert. Unter einem „angiogenen Stimulus“ wird ein
chemischer Reiz in einem Gewebe oder Blutgefäß ei-
nes menschlichen oder tierischen Körpers verstan-
den, der spezifisch auf ausdifferenzierte Endothel-

zellen wirkt und deren Migration zu der Stelle des Körpers bewirkt, von der der chemische Reiz ausgeht. Der angiogene Stimulus bewirkt auf diese Weise eine Induzierung von Angiogenese.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Erythropoietin und/oder Derivaten davon zur Erhöhung der Adhäsionsfähigkeit sich differenzierender endothelialer Vorläuferzellen vorgesehen. Erfindungsgemäß wird Erythropoietin
10 insbesondere verwendet, um die Fähigkeit endothelialer Vorläuferzellen zur Adhäsion, das heißt zur Zell-Zell-Adhäsion zu verbessern. Die Adhäsion von sich differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen beziehungsweise ausdifferenzierten Endothelzellen
15 ist eine der Grundvoraussetzungen zur Bildung neuer Gefäße oder eines neuen Endothelgewebes. Die Zelladhäsion wird durch Proteinmoleküle vermittelt.

- Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von Erythropoietin zur Stimulation der Gefäßneubildung, insbesondere die Stimulation von Vaskulogenese. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „Vaskulogenese“ die Gefäßneubildung aus sich in situ differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen verstanden. Erfindungsgemäß
20 wird durch den Einsatz von Erythropoietin also erreicht, dass sich endotheliale Vorläuferzellen, in verstärktem Maße an einer Gefäßneubildung beziehungsweise an einer lokalen Gefäßneubildung zur Wiederstellung geschädigter Gefäßbereiche betei-
25 gen. Erfindungsgemäß ist also vorgesehen, dass die Verwendung von Erythropoietin und/oder dessen Derivaten die Bildung neuer Blutgefäße und/oder den Er-
30

satz geschädigter Gefäßbereiche durch lokale Blutgefäßneubildung fördert.

5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Erythropoietin und/oder Derivaten davon zur Stimulation endothelialer Vorläuferzellen zur Bildung von Endothelgewebe vorgesehen.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Erythropoietin und/oder Derivaten davon zur Therapie von Krankheiten des menschlichen oder tierischen Körpers, die im Zusammenhang mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder von Endothelzellen stehen, oder von Folgerkrankungen davon vorgesehen.

15 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Krankheiten“ oder „Erkrankungen“ Störungen der Lebensvorgänge in Organen oder im gesamten Organismus mit der Folge von subjektiv empfundenen beziehungsweise objektiv feststellbaren körperlichen, seelischen beziehungsweise geistigen Veränderungen verstanden. Erfindungsgemäß handelt es sich
20 insbesondere um Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder von Endothelzellen im Zusammenhang stehen, das heißt Krankheiten, die entweder die Folge einer derartigen
25 Dysfunktion dieser Zellen sind oder die durch diese Zellen vermittelt werden. Unter „Folgerkrankungen“ werden Sekundärkrankheiten verstanden, das heißt eine zu einem primären Krankheitsbild hinzutretende zweite Erkrankung.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „Dysfunktion“ von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen eine Störung wesentlicher Zellfunktionen wie Stoffwechselleistungen, Reizbeantwortung, Motilität, Teilungsverhalten oder Differenzierungsverhalten dieser Zellen verstanden. Eine Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen kann beispielsweise darin bestehen, dass diese Zellen nicht oder nur in ungenügendem Maße proliferieren. Da durch die Verwendung von Erythropoietin die Proliferation endothelialer Vorläuferzellen stimuliert wird, kann dadurch das defizitäre Teilungsverhalten sowohl von endothelialen Vorläuferzellen als auch von bereits ausdifferenzierten Endothelzellen ausgeglichen und die Anzahl von endothelialer Vorläuferzellen beziehungsweise Endothelzellen erhöht werden. Eine Dysfunktion endothelialer Vorläuferzellen kann beispielsweise in der gestörten Fähigkeit dieser Zellen zur Differenzierung zu Endothelzellen bestehen. Die Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen kann auch bedingt sein durch deren gestörte Fähigkeit zur Adhäsion und/oder deren gestörte Fähigkeit zur Migration in Richtung eines angiogenen oder vaskulogenen Stimulus. Solche Dysfunktionen von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen können dazu führen, dass beispielsweise die Neubildung von Endothelgewebe und/oder Vaskulogenese beeinträchtigt oder verhindert wird. Eine Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen kann auch pathogen bedingt sein, beispielsweise durch Hypertonie, Hyperlipoproteinämie oder Diabetes. Die Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen kann sich

beispielsweise in einer verminderten Produktion von NO (=EDRF), erhöhter Endothelin-Produktion und/oder in einer verstärkten Produktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 äußern.

- 5 Erfindungsgemäß handelt es sich bei den Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen, insbesondere um Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Endothel-vermittelte chronische Entzündungserkrankungen wie Gefäßentzündungen, Endotheliose einschließlich Retikuloendotheliose, Atherosklerose, koronare Herzkrankheit, Myokard-Ischämie, Angina pectoris, altersbedingte Herz-Kreislauf-Erkrankung, ischämische Erkrankungen der Extremitäten, Raynaud-Krankheit, Präeklampsie, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Niereninsuffizienz, insbesondere terminale Niereninsuffizienz, sowie Folgeerkrankungen davon.

- 20 Eine „Hypercholesterinämie“ ist durch erhöhte Konzentrationen von Cholesterin im Blut gekennzeichnet. Die weitaus häufigste Form der primären Hypercholesterinämien ist die polygene Hypercholesterinämie. Sekundäre Hypercholesterinämien treten häufig bei Diabetes mellitus, nephrotischem Syndrom, Hypothyreose und Lebererkrankungen auf.

- 30 Unter „Diabetes mellitus“ werden verschiedene Formen von Glucose-Stoffwechselstörungen mit unterschiedlicher Ätiologie und Symptomatik zusammengefasst. Für die Entstehung vaskulär bedingter diabetischer Komplikationen ist insbesondere das AGE-RAGE-System verantwortlich. AGEs (Advanced Glycati-

on Endproducts) entstehen über eine Reihe komplexer Reaktionen nach lang andauernder Exposition von Proteinen oder Lipiden mit reduzierenden Zuckern, beispielsweise Glucose. Die Bildung von AGEs findet
5 während des normalen Alterungsprozesses sowie in gesteigertem Maße bei Diabetes mellitus und Alzheimer-Krankheit statt. Über die Bindung von AGEs kommt es zu oxidativem Stress, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit zu einer Stö-
10 rung der endothelialen Homöostase.

„Endothel-vermittelte chronische Entzündungserkrankungen“ sind Erkrankungen oder Zustände eines menschlichen oder tierischen Körpers, die auf einer Abwehrreaktion des Organismus und seiner Gewebe
15 auf schädigende Reize beruhen, wobei bestimmte Signalmoleküle die Eigenschaften von Endothelzellen verändern, so dass im Zusammenspiel mit der Aktivierung anderer Zelltypen Leukozyten an den Endothelzellen haften bleiben, schließlich in das Gewe-
20 be eindringen und dort eine Entzündung auslösen. Ein Beispiel für eine Endothel-vermittelte Entzündung ist die leukozytische Vaskulitis. Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung eines Endothel-vermittelten entzündlichen Geschehens spielt der
25 Transkriptionsfaktor NF- κ B. Ein anderes System, dass zur Entstehung Endothelzell-vermittelter chronischer Entzündungen führt, ist das AGE-RAGE-System.

Unter „Endotheliose“ werden degenerative und proli-
30 ferative Endothelveränderungen bei der nicht-thrombopenischen Purpura verstanden. Unter „Retikuloendotheliose“ werden Krankheiten des retikulo-

histiozytären Systems, wie Retikulum, Retikulo-
Retikulohistiozytose und Hand-Schüller-Christian-
Krankheit verstanden.

5 Unter „Myokard-Ischämie“ wird die Blutleere oder
Minderdurchblutung, also eine Durchblutungsstörung
der muskulären Wand des Herzens infolge unzurei-
chender oder fehlender arterieller Blutzufuhr ver-
standen. Bei einem „Herzinfarkt“ oder „Myokardin-
10 farkt“ handelt es sich um eine Nekrose eines um-
schriebenen Herzmuskelbezirks, die meist als akut
auftretende Komplikation bei chronischer koronarer
Herzkrankheit auftritt. Bei der „koronaren Herz-
krankheit“ oder „ischämischen Herzkrankheit“ han-
delt es sich um eine degenerative Koronarerkran-
15 kung, die bedingt durch eine Einengung oder einen
Verschluss von Herzkranzgefäßen zu einer verminder-
ten Durchblutung des Herzmuskels führt. Unter „An-
gina pectoris“ wird eine akute Koronarinsuffizienz
oder Stenokardie verstanden, die durch ein Missver-
20 hältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf
bei koronarer Herzkrankheit, Koronarspasmen, Stö-
rungen des Blutflusses, Herzrhythmusstörungen, Hy-
pertonie oder Hypotonie ausgelöst werden kann. Un-
ter „Raynaud-Krankheit“ werden durch Vasokonstrik-
25 tion, das heißt Gefäßkrämpfe, bedingte, anfallartig
auftretende Ischämiezustände meist an den Arterien
der Finger verstanden. Die primäre Raynaud-
Krankheit ist eine rein funktionelle Störung der
kleinen versorgenden Gefäße der Akren, während der
30 sekundären Raynaud-Krankheit eine andere Krankheit
zugrunde liegt, beispielsweise eine Gefäßentzün-
dung.

Die „Präeklampsie ist eine Endothel-und Gefäß-
krankheit des mütterlichen Organismus und scheint
die Auswirkung von endotheliotropen Substanzen aus
der Plazenta zu sein. Die Präeklampsie ist eine
5 Multisystem-Erkrankung, die zu Funktionsstörungen
zahlreicher Organe führen und sich in vielfältigen
Symptomen äußern kann. Die für die Erkrankung typi-
schen Durchblutungsstörungen sind die Folge eines
erhöhten Gefäßwiderstandes, der lokal unterschied-
10 lich ausgeprägt sein kann. Für die Präeklampsie gilt
als gesichert, dass eine endotheliale Dysfunktion
zentraler Bestandteil der Pathogenese ist.

Unter „Niereninsuffizienz“ wird die eingeschränkte
Fähigkeit der Nieren zur Ausscheidung harnpflichti-
15 ger Substanzen verstanden, wobei in fortgeschritte-
nen Stadien auch die Regulationsfähigkeit des E-
lektrolyt-, Wasser- und Säure-Basen-Haushalts ver-
loren geht. Die terminale Niereninsuffizienz ist
durch einen Zusammenbruch der exkretorischen und
20 endokrinen Nierenfunktion gekennzeichnet. Ursachen
der chronischen Niereninsuffizienz sind unter ande-
rem chronische Glomerulopathie, chronische Pyelo-
nephritis, Analgetika-Nephropathie, obstruktive U-
ropathie sowie Arterio- und Arteriolo-sklerose.

25 Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass Erythropoietin
in einer therapeutisch wirksamen Dosis an einen Pa-
tienten verabreicht wird, die ausreicht, den Zu-
stand einer Krankheit, die mit einer Dysfunktion
von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endo-
30 thelzellen im Zusammenhang steht, zu heilen oder
diesem Zustand vorzubeugen, die Progression einer
solchen Krankheit zu stoppen und/oder die Symptome

einer solchen Krankheit zu lindern. Die an einen Patienten zu verabreichende Dosis hängt von vielen Faktoren, beispielsweise dem Alter, Körpergewicht und Geschlecht des Patienten, der Schwere der Erkrankung usw. ab. Erfindungsgemäß wird Erythropoietin insbesondere in Dosen von 500 bis 50.000 Einheiten/Woche verabreicht, wobei vorzugsweise Dosen von 500 bis 2000 Einheiten/Woche je nach Schwere der begleitenden Erkrankung und in Abhängigkeit der Nierenfunktion vorgesehen sind.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung von Erythropoietin und/oder dessen Derivaten als Wirkstoff zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Arzneimittels zur Therapie von Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen.

Erfindungsgemäß wird unter einem „Wirkstoff“ ein körpereigener oder körperfremder Stoff verstanden, der bei Kontakt mit Zielmolekülen oder Zielzellen oder Zielgeweben spezifische Funktionen von Geweben, Organen oder Organismen in differenzierter Weise beeinflusst. Erfindungsgemäß ist also vorgesehen, dass Erythropoietin als Wirkstoff der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung bei Kontakt mit endothelialen Vorläuferzellen deren Proliferations-, Differenzierungs- und/oder Migrationsverhalten in einem menschlichen oder tierischen Organismus so beeinflusst, dass Dysfunktionen von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen ausgeglichen und die infolge dieser Dys-

funktionen auftretenden Krankheiten wirksam bekämpft, gelindert oder beseitigt werden können beziehungsweise diesen Krankheiten wirksam vorgebeugt werden kann.

- 5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „pharmazeutischen Zusammensetzung“ oder einem „Arzneimittel“ ein zu diagnostischen, therapeutischen und/oder prophylaktischen Zwecken verwendetes, also ein die Gesundheit eines menschlichen oder tierischen Körpers förderndes oder wiederherstellendes Gemisch verstanden, das mindestens einen natürlichen oder synthetisch hergestellten Wirkstoff umfasst, der die therapeutische Wirkung hervorruft. Die pharmazeutische Zusammensetzung
10 kann sowohl ein festes als auch ein flüssiges Gemisch sein. Beispielsweise kann eine den Wirkstoff umfassende pharmazeutische Zusammensetzung einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Komponenten enthalten. Darüber hinaus kann die pharmazeutische Zusammensetzung üblicherweise auf dem Fachgebiet verwendete Zusatzstoffe, beispielsweise Stabilisatoren, Fertigungsmittel, Trennmittel, Sprengmittel, Emulgatoren oder andere üblicherweise zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzung verwendete Stoffe umfassen.
15
20
25

Erfindungsgemäß ist insbesondere die Verwendung von Erythropoietin und/oder eines Derivats davon als Wirkstoff zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Endothel-vermittelten chronischen Entzündungskrankungen wie Gefäßentzündungen, Endotheliose
30 einschließlich Retikuloendotheliose, Atherosklero-

se, koronarer Herzkrankheit, Myokard-Ischämie, Angina pectoris, altersbedingter Herz-Kreislauf-Erkrankung, ischämischen Erkrankungen der Extremitäten, Raynaud-Krankheit, Präeklampsie, schwangerschaftsinduzierter Hypertonie und Niereninsuffizienz, insbesondere terminaler Niereninsuffizienz, sowie Folgeerkrankungen davon vorgesehen.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen, insbesondere intravenösen, intramuskulären, intrakutanen oder subkutanen Verabreichung verwendet wird. Vorzugsweise weist das Erythropoietin enthaltende Arzneimittel die Form einer Injektion oder Infusion auf.

15 In einer weiteren Verwendung ist vorgesehen, dass die Erythropoietin enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung oral verabreicht wird. Beispielsweise wird das Erythropoietin enthaltende Arzneimittel in einer flüssigen Darreichungsform wie einer Lösung, 20 Suspension oder Emulsion, oder einer festen Darreichungsform wie einer Tablette verabreicht.

In einer weiteren Verwendung ist vorgesehen, dass die pharmazeutische Zusammensetzung zur pulmonalen Verabreichung oder zur Inhalation geeignet ist. Erfindungsgemäß ist also vorgesehen, dass Erythropoietin in therapeutisch wirksamer Weise direkt an die Lungen des Patienten verabreicht wird. Diese Form der Verabreichung von Erythropoietin ermöglicht eine schnelle Abgabe einer Erythropoietin-Dosis an 25 einen Patienten, ohne dass eine Injektion vorgenommen werden muss. Bei Aufnahme von Erythropoietin 30

über die Lungen können erhebliche Erythropoietin-Mengen über die Lunge an den Blutkreislauf abgegeben werden, was im Blutkreislauf zu erhöhten Erythropoietin-Mengen führt. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der über die Lunge aufzunehmenden pharmazeutischen Zusammensetzung um eine wässrige oder nichtwässrige Lösung oder um ein Trockenpulver. Bei Vorliegen des pulmonal zu verabreichende, Erythropoietin enthaltenden Arzneimittel in Form eines Trockenpulvers umfasst dieses vorzugsweise Erythropoietin-enthaltende Partikel, wobei die Partikel einen Durchmesser von weniger als 10 µm aufweisen, so dass das Medikament auch distale Bereiche der Lunge des Patienten erreichen kann. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass das pulmonal zu verabreichende Medikament in Form eines Aerosols vorliegt.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Therapie von Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung neben Erythropoietin als Wirkstoff mindestens einen weiteren zusätzlichen Wirkstoff zur Stimulierung von endothelialen Vorläuferzellen enthält.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem weiteren Wirkstoff um einen Wirkstoff, der insbesondere die physiologische Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark stimuliert. Erfindungs-

gemäß kann es sich bei dem weiteren Wirkstoff aber auch um einen Wirkstoff handeln, der insbesondere das Teilungsverhalten, also die Proliferation endothelialer Vorläuferzellen stimuliert. Erfindungsgemäß besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass der weitere Wirkstoff insbesondere das Differenzierungsverhalten und/oder das Migrationsverhalten endothelialer Vorläuferzellen stimuliert. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem weiteren, endotheliale Vorläuferzellen stimulierenden Wirkstoff um VEGF, PlGF, GM-CSF und/oder einen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, insbesondere ein Statin wie Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin.

Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, dass der mindestens eine weitere Wirkstoff insbesondere ausdifferenzierte Endothelzellen, das heißt deren Proliferation und/oder Migration stimuliert, nicht jedoch endotheliale Vorläuferzellen. Besonders bevorzugt handelt es sich dabei um bFGF (basic fibroblast growth factor) oder Angiogenin.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung von Erythropoietin und/oder Derivaten davon als Wirkstoff zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Stimulierung endothelialer Vorläuferzellen, insbesondere zur Stimulierung der Mobilisierung, Proliferation, Differenzierung zu Endothelzellen und/oder zur Migration in Richtung eines vaskulogenen oder angiogenen Stimulus. Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung von Erythropoietin und/oder dessen Derivaten als Wirkstoff zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Stimulierung von Vaskulogenese

und/oder Endothelbildung, insbesondere im adulten menschlichen oder tierischen Organismus vorgesehen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch pharmazeutische Zusammensetzungen zur Stimulierung von
5 endothelialen Vorläuferzellen, insbesondere zur Stimulation von deren Mobilisierung, Proliferation, Differenzierung zu Endothelzellen und/oder Migration in Richtung eines vaskulogenen oder angiogenen Stimulus, zur Stimulation der Vaskulogenese
10 und/oder Endothelbildung und zur Behandlung von Krankheiten des menschlichen oder tierischen Körpers, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen
15 oder Arzneimittel, die Erythropoietin als Wirkstoff und mindestens einen weiteren Wirkstoff zur Stimulation von endothelialen Vorläuferzellen und/oder ausdifferenzierten Endothelzellen umfassen. In bevorzugter Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die Erythropoietin und mindestens einen weiteren Wirkstoff aus der Gruppe bestehend aus VEGF, PlGF, GM-CSF, einen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, insbesondere
20 ein Statin wie Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin, bFGF und Angiogenin umfassen.
25

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung eines transplantierbaren Endothelzell-
30 Präparates. Erfindungsgemäß ist dabei insbesondere vorgesehen, dass Endothelzellen in vitro durch Kultivierung endothelialer Vorläuferzellen in Gegen-

wart von Erythropoietin hergestellt und anschließend in einen Empfängerorganismus, insbesondere einen Organismus, der an einer Krankheit leidet, die im Zusammenhang mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen steht, transplantiert werden. Beispielsweise können mononukleäre Zellen (MNC) aus Blut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und in geeigneten Kulturmedien in vitro kultiviert werden. Verfahren zur Isolierung und in vitro-Kultivierung mononukleärer Zellen sind beispielsweise in Asahara, Science, 275 (1997), 964-967; Dimmeler et al., J. Clin. Invest., 108 (2001), 391-397, und Llevadot et al., J. Clin. Invest., 108 (2001), 399-405, beschrieben. Anschließend werden die mononukleären Zellen in Gegenwart von Erythropoietin weiter kultiviert, um die in den MNCs enthaltenen endothelialen Vorläuferzellen bezüglich ihres Proliferations- und Differenzierungsverhaltens zu stimulieren und insbesondere die Anzahl differenzierter adhärenter Endothelzellen zu erhöhen. Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, dass die Kultivierung der MNCs in Gegenwart von Erythropoietin und mindestens einer weiteren Substanz, die die Proliferation und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen stimuliert, erfolgt. Besonders bevorzugt wird als weitere Substanz VEGF, PIGF, GM-CSF oder ein HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor wie ein Statin, insbesondere Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin, eingesetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Erythropoietin zur Vorbehandlung von zu transplantierenden Geweben o-

der Organen vorgesehen. Dabei werden die Transplantate vor der Transplantation, vorzugsweise unmittelbar davor, in einen Empfängerorganismus mit Erythropoietin behandelt. Durch die Behandlung der zu

5 transplantierenden Organe oder Gewebe vor Transplantation mit Erythropoietin wird erfindungsgemäß erreicht, dass sich in dem Transplantat nach erfolgter Transplantation in einen Körper aufgrund der induzierten Vaskulogenese schnell neue Blutgefäße bilden und diese neu gebildeten Blutgefäße

10 schnell mit dem Blutsystem des Empfängerorganismus verbunden werden. Ebenfalls wird auf diese Weise schnell die Bildung von Endothelien erreicht. Die Behandlung von Organ- oder Gewebetransplantaten mit

15 Erythropoietin bewirkt somit ein schnelleres Einwachsen dieser Systeme in den Körper, wodurch das Risiko einer Abstoßung erheblich vermindert wird.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Organ- oder Gewebetransplantate vor Transplantation mit Erythropoietin in Kombination mit mindestens einem weiteren Faktor, der endotheliale Vorläuferzellen stimuliert, behandelt werden. Vorzugsweise handelt es sich bei diesem

20 Faktor um eine Substanz aus der Gruppe bestehend aus VEGF, PlGF, GM-CSF und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, beispielsweise ein Statin, insbesondere Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin. In einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, dass die Organ- oder Gewebetransplantate vor Transplantation

25 neben Erythropoietin mit einer weiteren Substanz, die die Proliferation und Migration ausdifferenzierter Endothelzellen stimuliert, behandelt werden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dieser

30

Substanz um Angiogenin oder bFGF. In einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, dass die Vorbehandlung der Organ- oder Gewebetransplantate mit Erythropoietin unter Verwendung isolierter und gegebenenfalls in vitro expandierter endothelialer Vorläuferzellen erfolgt.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass Erythropoietin zur Herstellung von implantierbaren oder transplantierbaren, zellhaltigen in vitro-Organen oder Geweben verwendet wird. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass das in vitro hergestellte Organ oder Gewebe vor Transplantation oder Implantation mit Erythropoietin behandelt wird, um die im Körper des Empfängerorganismus vorhandenen endothelialen Vorläuferzellen, insbesondere deren physiologische Mobilisierung, Migration, Proliferation und Differenzierung, zu stimulieren. Durch die Behandlung des in vitro-Organ- oder Gewebes vor Transplantation beziehungsweise Implantation mit Erythropoietin wird erfindungsgemäß erreicht, dass sich in dem in vitro-Organ- oder Gewebesystem nach erfolgter Transplantation oder Implantation in einen Körper aufgrund der induzierten Vaskulogenese schnell neue Blutgefäße bilden und diese neu gebildeten Blutgefäße schnell mit dem Blutsystem des Empfängerorganismus verbunden werden. Ebenfalls wird auf diese Weise schnell die Bildung von Endothelien und damit eine Reendothelialisierung erreicht. Die Behandlung der in vitro-Organ- oder Gewebesysteme mit Erythropoietin bewirkt somit ein schnelleres Einwachsen dieser Systeme in den Körper, wodurch das Risiko einer Absto-

Bung erheblich vermindert wird, und dient der Protektion des Transplantats.

Unter einem „in vitro-Organ- oder Gewebesystem“ wird ein transplantierbares oder implantierbares zellhaltiges Gewebe oder Organ verstanden, das in vitro unter Verwendung definierter Zellen und/oder definierter Gewebe und unter definierten Kulturbedingungen hergestellt wird. Unter einem „implantierbaren in vitro-Organ- oder Gewebesystem“ wird ein System verstanden, das neben Zellen körperfremde Materialien umfasst. Unter einem „transplantierbaren in vitro-Organ- oder Gewebesystem“ wird insbesondere ein zellhaltiges System verstanden, das neben Zellen, Geweben oder Organen des gleichen oder eines anderen Individuums körpereigene Substanzen enthält. In vitro-Organe oder Gewebe sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass sie bezüglich ihres Aufbaus weitgehend den nativen zu ersetzenden Organen oder Geweben entsprechen und somit die Funktion der ersetzten nativen Organe oder Gewebe in vivo übernehmen können.

In einer erfindungsgemäßen Ausgestaltung ist vorgesehen, dass die in vitro-Organ- oder Gewebesysteme vor Transplantation beziehungsweise Implantation mit Erythropoietin in Kombination mit mindestens einem weiteren Faktor, der endotheliale Vorläuferzellen stimuliert, behandelt werden. Vorzugsweise handelt es sich bei diesem Faktor um eine Substanz aus der Gruppe bestehend aus VEGF, PlGF, GM-CSF und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, beispielsweise ein Statin, insbesondere Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin. In einer weiteren Ausgestaltung ist

vorgesehen, dass die in vitro-Organ- oder Gewebesysteme vor Transplantation beziehungsweise Implantation neben Erythropoietin mit einer weiteren Substanz, die die Proliferation und Migration ausdifferenzierter Endothelzellen stimuliert, behandelt werden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dieser Substanz um Angiogenin oder bFGF. In einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, dass die in vitro-Organ- oder Gewebesysteme zusätzlich isolierte und gegebenenfalls in vitro expandierte endotheliale Vorläuferzellen enthalten.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung von Gefäßprothesen oder Herzklappen, wobei die Gefäßprothesen oder Herzklappen vor Insertion in einen Körper, insbesondere einen menschlichen Körper, mit Erythropoietin beschichtet werden. Durch die Beschichtung der Gefäßprothesen oder Herzklappen mit Erythropoietin wird erreicht, dass endotheliale Vorläuferzellen im Körper des Empfängerorganismus stimuliert werden, wobei insbesondere ihre Mobilisierung aus dem Knochenmark, ihre Proliferation, ihre Differenzierung zu Endothelzellen und ihre Migration zu den eingesetzten Gefäßprothesen oder Herzklappen stimuliert werden. Dadurch bedingt, kommt es schneller zu einer Ausbildung von Endothelschichten auf den eingesetzten Gefäßprothesen und zu einem schnelleren Einwachsen in die betroffenen Körperbereiche. In einer bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass zur Beschichtung der Gefäßprothesen und Herzklappen zusätzlich isolierte und gegebenenfalls in vitro expandierte endotheliale Vorläuferzellen eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Stimulation der Endothelzell-Bildung in vitro, umfassend

- 5 a) die Isolierung endotheliale Vorläuferzellen
 enthaltender Zellpopulationen aus Blut mit-
 tels Dichtegradienten-Zentrifugation,
- b) die Kultivierung der isolierten, endotheliale
 Vorläuferzellen enthaltenden Zellpopulationen
 in Zellkulturmedium, und
- 10 c) die Kultivierung der Zellpopulationen in Ge-
 genwart von Erythropoietin.

Erfindungsgemäß kann die Kultivierung der Zellpopu-
lationen in Gegenwart einer weiteren Substanz, die
endotheliale Vorläuferzellen enthält, erfolgen.

- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Ver-
fahren zur Behandlung von Krankheiten, die mit ei-
ner Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen
und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen, um-
fassend:

- 20 a) die Isolierung endotheliale Vorläuferzellen
 enthaltender Zellpopulationen aus Blut mit-
 tels Dichtegradienten-Zentrifugation,
- b) die Kultivierung der endotheliale Vorläufer-
 zellen enthaltenden Zellpopulationen in Zell-
25 kulturmedium,
- c) die Kultivierung der endotheliale Vorläufer-
 zellen enthaltenden Zellpopulationen in Ge-

genwart von Erythropoietin zur Stimulation der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen und deren Differenzierung zu Endothelzellen,

- 5 d) die Isolierung und Aufreinigung der ausdifferenzierten Endothelzellen, und
- e) die Transplantation der ausdifferenzierten Endothelzellen in einen Körper mit einer Krankheit, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang steht.
- 10

Erfindungsgemäß können die endotheliale Vorläuferzellen enthaltenden Zellpopulationen in Gegenwart mindestens eines weiteren Wirkstoffes ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus VEGF, PIGF, GM-CSF und/oder einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor kultiviert werden. Vorzugsweise handelt es sich bei dem zur Kultivierung verwendeten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor um ein Statin wie Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin.

15

20

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen, sieht also vor, endotheliale Vorläuferzellen aus dem Blut eines menschlichen Organismus zu isolieren, unter Verwendung von Erythropoietin in vitro zu expandieren und zu Endothelzellen zu differenzieren und nach Aufreinigung und Isolierung der ausdifferenzierten Endothelzellen beziehungsweise der sich differenzierenden en-

25

30

dothelialen Vorläuferzellen diese anschließend gezielt in einen Körperbereich, ein Gewebe oder ein Organ eines Patienten zu transplantieren, der/das aufgrund der Dysfunktion endothelialer Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen geschädigt ist, um dort eine lokale Endothel-Neubildung zu induzieren. Auf diese Weise ist eine gezieltere und schnellere Behandlung der geschädigten Körperbereiche, Gewebe und/oder Organe des Patienten möglich. Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere zur Behandlung von Krankheiten und Zuständen des menschlichen Körpers wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Endothel-vermittelten chronischen Entzündungserkrankungen wie Gefäßentzündungen, Endotheliose einschließlich Retikuloendotheliose, Atherosklerose, koronarer Herzkrankheit, Myokard-Ischämie, Angina pectoris, altersbedingter Herz-Kreislauf-Erkrankung, ischämischen Erkrankungen der Extremitäten, Raynaud-Krankheit, Präeklampsie, schwangerschaftsinduzierter Hypertonie und Niereninsuffizienz, insbesondere terminaler Niereninsuffizienz, sowie Folgeerkrankungen geeignet.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Gefäßerkrankungen, umfassend:

- a) die Isolierung endotheliale Vorläuferzellen enthaltender Zellpopulationen aus Blut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation,
- b) die Kultivierung der endotheliale Vorläuferzellen enthaltenden Zellpopulationen in Zellkulturmedium,

- 5 c) die Kultivierung der endotheliale Vorläuferzellen enthaltenden Zellpopulationen in Gegenwart von Erythropoietin zur Stimulation der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen und deren Differenzierung zu Endothelzellen,
- d) die Isolierung und Aufreinigung der ausdifferenzierter Endothelzellen, und
- 10 e) die Transplantation der Endothelzellen in einen Körper mit einer Gefäßerkrankung.

Erfindungsgemäß besteht die Möglichkeit, die endothelialen Vorläuferzellen enthaltenden Zellpopulationen in Gegenwart mindestens eines weiteren Wirkstoffes ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
15 VEGF, PIGF, GM-CSF und/oder einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor zu kultivieren. Vorzugsweise handelt es sich bei dem zur Kultivierung verwendeten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor um ein Statin wie Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin.

20 : Das erfindungsgemäße Verfahren zur Behandlung von Gefäßerkrankungen sieht also vor, endotheliale Vorläuferzellen aus dem Blut eines menschlichen Organismus zu isolieren, unter Verwendung von Erythropoietin in vitro zu expandieren und zu Endothelzellen
25 zu differenzieren und nach Aufreinigung und Isolierung der ausdifferenzierten Endothelzellen beziehungsweise der sich differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen diese anschließend gezielt in ein geschädigtes Blutgefäß oder einen ischämischen
30 Bereich zu transplantieren, um dort eine lokale Ne-

ovaskularisierung zu induzieren. Auf diese Weise ist eine gezieltere und schnellere Behandlung geschädigter Blutgefäße oder ischämischer Gewebe möglich. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Behandlung von Gefäßerkrankungen ist insbesondere zur Behandlung von Gefäßerkrankungen wie Ischämie, insbesondere cerebraler Ischämie, ischämischer Erkrankungen der Extremitäten, Myokard-Ischämie, Herzinfarkt, Schlaganfall, koronare Herzkrankheit, Angina pectoris, akuten Arterienverschluss, arterielle Verschlusskrankheit, Raynaud-Krankheit und Ergotismus geeignet.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert.

Figur 1 zeigt die Ergebnisse einer FACS-Analyse zirkulierender CD34⁺-Stammzellen (cSC). (A-D): Patientenproben; (E-F): isotypische Kontrollen. cSC wurden anhand der zusätzlichen Expression des CD34-Markers (B und F), anhand der charakteristischen geringen bis mittleren CD45-Antigen-Expression (C und G) und anhand der charakteristischen Lichtstreuungs-Eigenschaften (D und H) identifiziert. Die absolute cSC-Anzahl wurde pro 100.000 Mono-und Lymphozyten berechnet.

Figur 2 zeigt eine quantitative Bestimmung zirkulierender Stammzellen mittels Durchflusszytometrie. Die Figur zeigt die zeitabhängige Wirkung einer Erythropoietin-Behandlung unter Verwendung von rhEPO

(rekombinantes menschliches Erythropoietin) nach 0, 2, 4, 6 und 8 Wochen. n=11, die Werte entsprechen Mittelwerten +/-Standardabweichung. Mediane als Linie dargestellt.

- 5 *: p < 0,01 im Vergleich zu 2 Wochen; ψ : p < 0,05 im Vergleich zu 4 Wochen, #: p < 0,05 im Vergleich zu 8 Wochen.

Figur 3 zeigt eine quantitative Bestimmung kultivierter endothelialer Vorläuferzellen (EPC). Die
10 Figur zeigt, dass die rhEPO-Behandlung die Anzahl von EPCs erhöht. EPCs wurden vor der Behandlung renaler Patienten mit rhEPO sowie 2, 4, 6 und 8 Wochen nach Behandlung der Patienten mit rhEPO isoliert und anhand ihrer Adhäsionsfähigkeit und der
15 beiden Marker acLDL-Dil und UEA-1 FITC charakterisiert. n=11, die Werte entsprechen Mittelwerten +/-Standardabweichung. Mediane als Linie dargestellt.

*: p < 0,01 gegenüber dem Zeitraum vor Behandlung;
#: p < 0,001 gegenüber dem Zeitraum vor Behandlung.

20 Beispiel

Die Wirkung von Erythropoietin bei Patienten mit renaler Anämie (Hb < 10,5 g/dl) als Folge von Nierenkrankheit im Endstadium (präterminale Nierensuffizienz; Creatinin-Clearance < 35 ml/min) wurde
25 untersucht. 11 Patienten wurden über einen Zeitraum von mindestens 8 Wochen mit Erythropoietin in wöchentlichen Dosen von durchschnittlich 5000 IU rhEPO (rekombinantes humanes Erythropoietin) intravenös beziehungsweise subkutan behandelt. Nach Erythropoietin-Behandlung wurden die endothelialen
30

Vorläuferzellen im Blut der Patienten über einen Zeitraum von 20 Wochen untersucht, wobei nach 0, 2, 4, 6 und 8 Wochen endotheliale Vorläuferzellen bezüglich ihrer Anzahl als auch ihres Differenzierungsstatus mittels Durchflusszytometrie und eines Kulturtestes analysiert wurden.

Bei zirkulierenden peripheren Blutstammzellen (CPBSC) handelt es sich um eine kleine Zellpopulation, die sowohl das CD34-Antigen als auch das CD45-Antigen exprimieren. Auf der Basis der ISHAGE-Richtlinien wurde ein Test zur Bestimmung der Anzahl von CPBSC mittels Durchflusszytometrie entwickelt (Sutherland et al., J. Hematother., 5 (1996), 213-226). Unter Verwendung dieses Tests wurden sowohl das Expressionsmuster von CD34- und CD45-Zellen als auch die Morphologie der Stammzellen bestimmt. Auf diese Weise wurde sowohl die absolute Anzahl von CPBSC pro μ l als auch der prozentuale Anteil von CPBSC an der Gesamtleukozytenzahl bestimmt.

Figur 1 zeigt die Ergebnisse einer FACS-Analyse zirkulierender CD34⁺-Stammzellen auf der Basis der ISHAGE-Richtlinien.

Figur 2 zeigt die Anzahl der mittels FACS-Analyse ermittelten CD34⁺-Stammzellen über einen Zeitraum von 8 Wochen.

Zellkultur-Test

Mononucleäre periphere Blutzellen (PBMCs) wurden mittels Dichtezentrifugation über Ficoll aus menschlichen Blutproben entsprechend dem in Asaha-

- ra, Science, 275 (1997), 964-967, beschriebenen Verfahren isoliert. Die Zellen wurden auf Kulturplatten mit Fibronectin ausplattiert und in EC-Basalmedium gehalten. EC-Basalmedium besteht aus
- 5 EBM-2-Basalmedium (Fa. Clonetics) und EGM-2 Quots (hEGF; GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B) FBS, VEGF, hFGF-B (w/heparin), R³-IGF-1, Ascorbic Acid, Heparin). Nach 4-tägiger Kultivierung wurden nicht-adhären
- 10 fernt. Die verbleibenden adhären
- 15 ten Zellen wurden mit Trypsin behandelt und erneut ausgesät. Anschließend wurden sie 7 Tage kultiviert. Zellen mit endothelialem Phänotyp wurden durch Positivfärbung bezüglich zwei unterschiedlicher Endothelialmarker identifiziert. Dabei handelt es sich um DiI-markiertes acetyliertes Lipoprotein geringer Dichte (acLDL-DiI) und Ulex europaeus-Aglutinin-1 (UEA-1). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Figur 3 dargestellt.
- 20 Die Ergebnisse zeigen, dass Erythropoietin endotheliale Vorläuferzellen mobilisieren und die Anzahl zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen erhöhen kann. Dabei werden funktionelle Defizite, die unter bestimmten pathologischen Zuständen wie renaler Anämie auftreten, ausgeglichen.
- 25

Mittels Durchflusszytometrie wurde ermittelt, dass bei Patienten mit Nierenkrankheit im Endstadium die Anzahl zirkulierender CD34⁺-Stammzellen der Anzahl zirkulierender CD34⁺-Stammzellen im Blut von gesunden Probanden entspricht. Nach Beginn der Erythropoietin-Behandlung erhöht sich die Anzahl CD34⁺-Stammzellen im Blutkreislauf signifikant um mehr

30

als 50 %. Unter Verwendung des Zellkulturtestes wurde bestimmt, dass nach Behandlung mit Erythropoietin die Anzahl der Zellen, die einen endothelialen Phänotyp entwickeln, dramatisch ansteigt. In
5 einem funktionellen Zellkulturtest erhöhte sich die stark beeinträchtigte Fähigkeit von endothelialen Vorläuferzellen um das mehr als 3-fache.

5 **Ansprüche**

1. Verwendung von Erythropoietin und/oder Derivaten davon zur Stimulation der physiologischen Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen, der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen, der Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen zu Endothelzellen und/oder der Migration endothelialer Vorläuferzellen in Richtung eines angiogenen oder vaskulogenen Stimulus.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Fähigkeit sich differenzierender endothelialer Vorläuferzellen zur Adhäsion gesteigert wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Stimulation endothelialer Vorläuferzellen zur Bildung von Endothelgewebe führt.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Stimulation der endothelialen Vorläuferzellen zur Ausbildung neuer Blutgefäße führt.
5. Verwendung von Erythropoietin und/oder Derivaten davon zur Stimulation der Bildung von Endothelgewebe.
6. Verwendung von Erythropoietin und/oder Derivaten davon zur Stimulation der Vaskulogenese.

7. Verwendung von Erythropoietin zur Therapie von Krankheiten des menschlichen oder tierischen Körpers, die im Zusammenhang mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder von Endothelzellen stehen.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Dysfunktion der endothelialen Vorläuferzellen in ihrer gestörten Fähigkeit zur Proliferation, ihrer gestörten Fähigkeit zur Differenzierung zu Endothelzellen, ihrer gestörten Fähigkeit zur Adhäsion und/oder ihrer gestörten Fähigkeit zur Migration in Richtung eines vaskulogenen oder angiogenen Stimulus besteht.
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, wobei die Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen die Bildung von Endothelgewebe und/oder Blutgefäßen beeinträchtigt oder verhindert.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei die Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen pathogen bedingt ist.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei es sich bei den Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen, um Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Endothelvermittelte chronische Entzündungserkrankungen, Endotheliose einschließlich Retikuloendotheliose, Atherosklerose, koronare Herzkrankheit, Myokard-

Ischämie, Angina pectoris, altersbedingte Herz-Kreislauf-Erkrankung, ischämische Erkrankungen der Extremitäten, Präeklampsie, Raynaud-Krankheit, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Niereninsuffizienz, insbesondere terminale Niereninsuffizienz, und Folgeerkrankungen davon handelt.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei Erythropoietin in einer Dosis von 500 bis 50.000 Einheiten/Woche verabreicht wird.

10 13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei Erythropoietin in einer Dosis von 500 bis 2000 Einheiten/Woche verabreicht wird.

14. Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Therapie von Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei es sich bei den Krankheiten, die mit einer Dysfunktion von endothelialen Vorläuferzellen und/oder Endothelzellen im Zusammenhang stehen, um Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Endothel-vermittelte chronische Entzündungserkrankungen, Endotheliose einschließlich Retikuloendotheliose, Atherosklerose, koronare Herzkrankheit, Myokard-Ischämie, Angina pectoris, altersbedingte Herz-Kreislauf-Erkrankung, ischämische Erkrankungen der Extremitäten, Raynaud-Krankheit, Präeklampsie, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Niereninsuffizienz, insbesondere

terminale Niereninsuffizienz, und Folgeerkrankungen davon handelt.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen, insbesondere intravenösen, intramuskulären, intrakutanen oder subkutanen Verabreichung geeignet ist.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung als Injektion oder Infusion vorliegt.

18. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur pulmonalen Verabreichung geeignet ist.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung als wässrige Lösung, nicht-wässrige Lösung oder Pulver vorliegt.

20. Verwendung nach Anspruch 18 oder 19, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Aerosol-Präparates vorliegt.

21. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur oralen Verabreichung geeignet ist.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung als Lösung, Suspension, Emulsion oder Tablette vorliegt.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung mindes-

tens einen weiteren Wirkstoff zur Stimulation endothelialer Vorläuferzellen enthält.

24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei es sich bei dem weiteren Wirkstoff um VEGF, PIGF, GM-CSF und/oder einen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor handelt.

25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor ein Statin wie Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin ist.

26. Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung eines transplantierbaren Endothelzell-Präparates.

27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei Endothelzellen in vitro durch Kultivierung endothelialer Vorläuferzellen in Gegenwart von Erythropoietin hergestellt werden.

28. Verwendung nach Anspruch 26 oder 27, wobei die Kultivierung der endothelialen Vorläuferzellen in Gegenwart mindestens eines weiteren Wirkstoffes ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus VEGF, PIGF, GM-CSF und/oder einen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, insbesondere Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin, erfolgt.

29. Verwendung von Erythropoietin zur Vorbehandlung von Gewebe- oder Organtransplantaten.

30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Gewebe- oder Organtransplantate unter Verwendung isolierter endothelialer Vorläuferzellen erfolgt.

31. Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung implantierbarer oder transplantierbarer zellhaltiger in vitro-Organ- oder Gewebesysteme, wobei die in vitro-Organ- oder Gewebesysteme vor Transplantation oder Implantation zur Induktion von Vaskulogenese und/oder Endothelzell-Bildung mit Erythropoietin behandelt werden.

32. Verwendung nach Anspruch 31, wobei die in vitro-Organ- oder Gewebesysteme endotheliale Vorläuferzellen enthalten.

33. Verwendung von Erythropoietin zur Herstellung von Gefäßprothesen oder Herzklappen, wobei die Gefäßprothesen oder Herzklappen mit Erythropoietin beschichtet werden.

34. Verwendung nach Anspruch 33, wobei die Beschichtung der Gefäßprothesen oder Herzklappen endotheliale Vorläuferzellen enthält.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 34, wobei Erythropoietin menschliches oder tierisches Erythropoietin ist.

36. Verwendung nach Anspruch 35, wobei Erythropoietin ein Derivat, ein Analog, eine Modifikation oder ein Mutein von Erythropoietin ist.

37. Verwendung nach Anspruch 35 oder 36, wobei Erythropoietin ein aus menschlichem Urin, dem Urin oder Plasma von an aplastischer Anämie leidenden Patienten, Gewebekulturen von menschlichen Nierenkrebszellen, die Fähigkeit zur Bildung von menschlichem Erythropoietin aufweisenden menschlichen

Lymphoblastenzellen oder einer durch Zellfusion einer menschlichen Zelllinie erhaltenen Hybridomkultur isoliertes Erythropoietin ist.

38. Verwendung nach Anspruch 35 oder 36, wobei Erythropoietin ein mittels DNA-Rekombinationstechniken hergestelltes Erythropoietin ist.

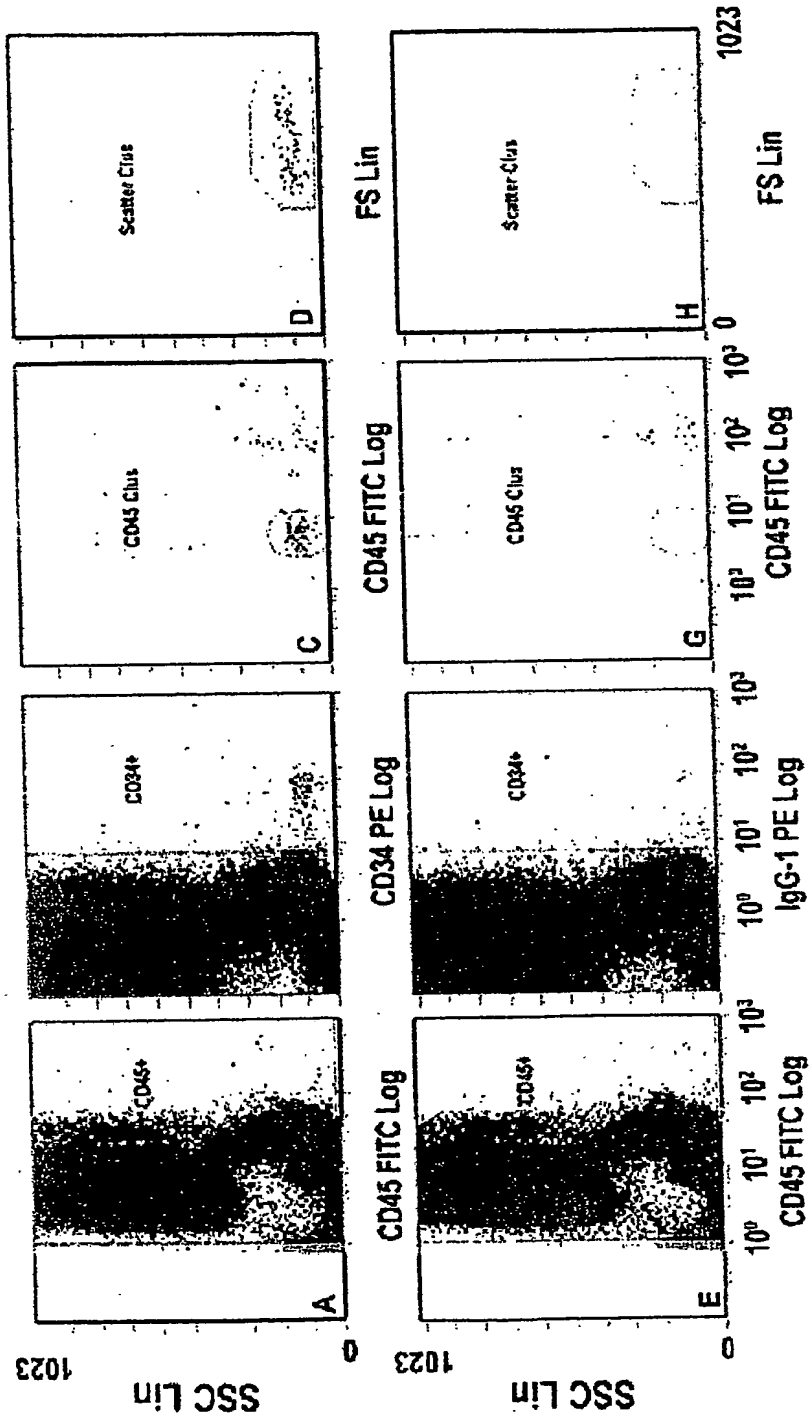
39. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Stimulation endothelialer Vorläuferzellen, zur Stimulation der Bildung von Endothelgewebe, zur Stimulation von Vaskulogenese und/oder zur Behandlung von Krankheiten, die im Zusammenhang mit einer Endotheldysfunktion stehen, umfassend Erythropoietin und/oder ein Derivat, ein Analog, eine Modifikation oder ein Mutein davon als Wirkstoff sowie mindestens einen weiteren Wirkstoff ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus VEGF, PlGF, GM-CSF und/oder einen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor.

40. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 39, wobei der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor ein Statin wie Simvastatin, Mevastatin oder Atorvastatin ist.

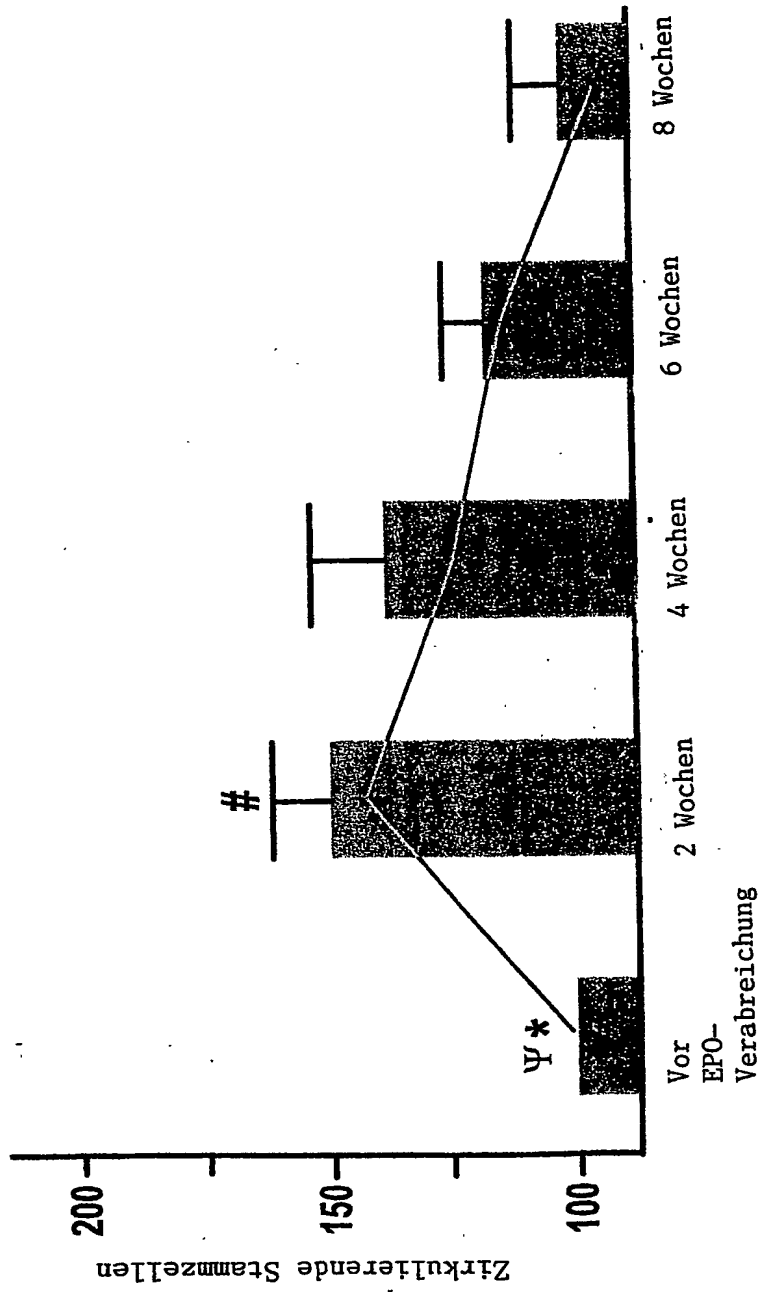
Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Erythropoietin zur Stimulierung der physiologischen Mobilisierung, Proliferation und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen, zur Stimulierung der Vaskulogenese, zur Therapie von Krankheiten, die mit einer Dysfunktion endothelialer Vorläuferzellen im Zusammenhang stehen, und zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen zur Behandlung derartiger Krankheiten sowie pharmazeutische Zusammensetzungen, die Erythropoietin und andere geeignete Wirkstoffe zur Stimulation endothelialer Vorläuferzellen umfassen.

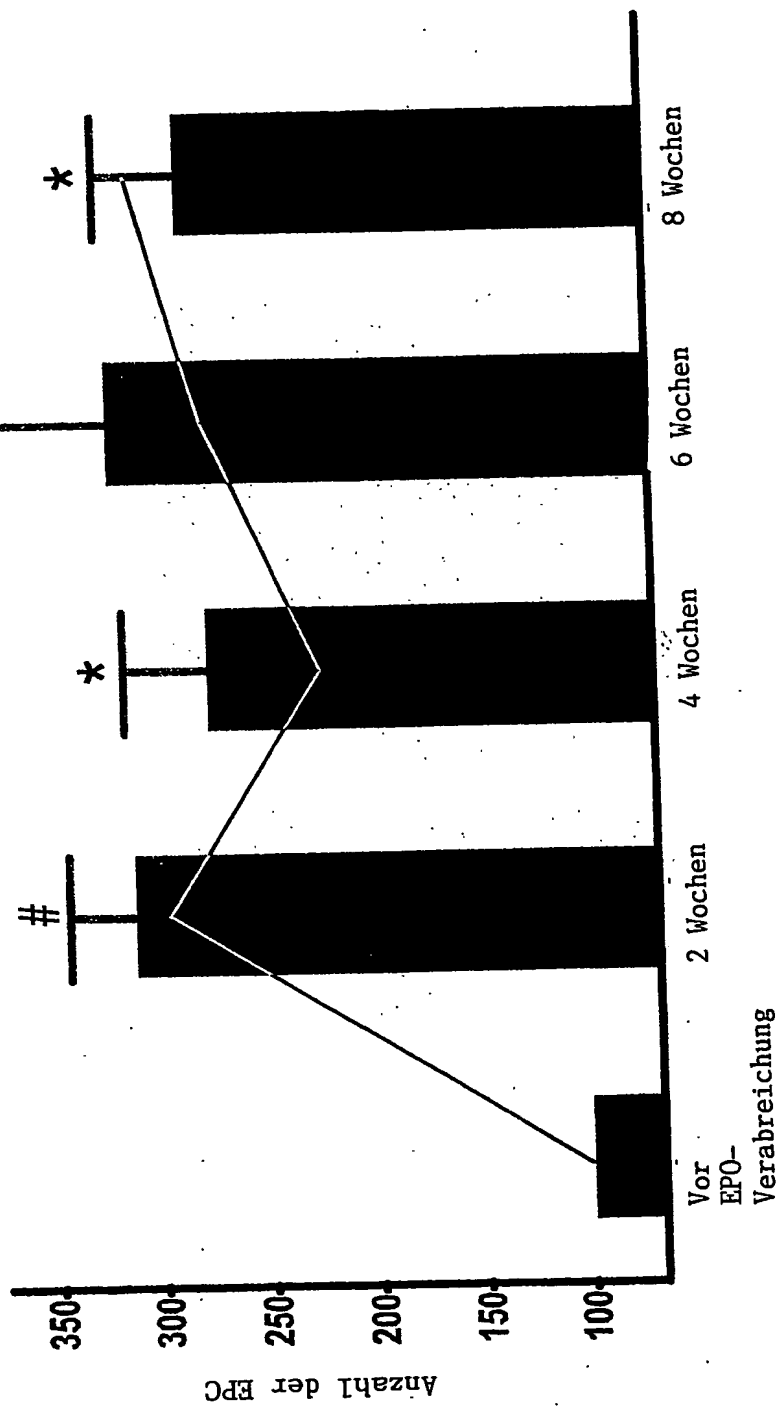
Figure 1



Figur 2



Figur 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.